

ETUDE CHIMIOTAXONOMIQUE DANS LES GENRES *MACROTYLOMA*, *DOLICHOS* ET *PSEUDOVIGNA*

GASTON A DARDENNE et PHILIPPE THONART

Laboratoire de Chimie Organique et Biologique, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique

et

EMILE OTOUL et ROBERT MARECHAL

Laboratoire de Phytotechnie des Régions Chaudes, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique

(Reçu le 31 octobre 1972 Accepté le 1 mars 1973)

Key Word Index—*Macrotyloma*, *Dolichos*, *Pseudovigna*, Leguminosae, acides aminés libres et totaux, dosage, chimiotaxonomie

Abstract—The variations of free, protein and total amino acid contents have been studied in seeds of *Macrotyloma*, *Dolichos* and *Pseudovigna*. The concentrations of free amino acids and of γ -glutamylphenylalanine seem to be characteristic of some species and also of some genera.

Résumé—Nous avons étudié les variations des teneurs en acides aminés libres, protéiques et totaux dans les graines de *Macrotyloma*, *Dolichos* et *Pseudovigna*. Les concentrations en acides aminés libres et en γ -glutamylphenylalanine semblent être caractéristiques de certaines espèces et aussi d'entités plus importantes telles que les genres.

INTRODUCTION

L'ETUDE de la répartition des acides aminés et des dipeptides libres chez les plantes (Champignons et graines de Spermatophytes) a été utilisée avec plus ou moins de succès dans des essais de caractérisation systématique. Heinemann et Casimir¹ ont réussi à mettre en évidence le genre *Aganicus* Fr. *sensu stricto* par la présence du *N*-(γ -L-glutamyl)-4-hydroxy-aniline. Les acides aminés libres de certaines espèces des genres *Phaseolus* L., *Lablab* Adans., *Dolichos* L., *Macrotyloma* (Wight et Arn.) Verdc. et *Vigna* Sav. ont été étudiés par Casimir et Le Marchand².

L'acide pipécolique est un élément de différenciation de certaines espèces de *Vigna* d'où il est absent. Bell³ a aussi découvert de fortes concentrations d'acide pipécolique dans huit des 10 espèces de *Phaseolinae* qu'il a étudiées, il n'en a décelé dans aucune des espèces de *Vigna* qu'il a analysées.

Au niveau des légumineuses, des études chimiotaxonomiques ont, entre autres, été réalisées avec *Astragalus* L.,⁴ *Vicia* L.,⁵ *Lathyrus* L.⁵ et *Acacia* Mill.⁶

Tous ces travaux ont été entrepris en utilisant comme critère de classification des espèces,

¹ HEINEMANN, P. et CASIMIR, J. (1961) *Revue de Mycologie* **26**, 24.

² CASIMIR, J. et LE MARCHAND, G. (1966) *Bull. Jard. Bot. Bruxelles* **36**, 53.

³ BELL, E. A. (1971) in *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (HARBORNE, J. B., BOULTER, D. and TURNER, B. L., eds), p. 200, Academic Press, London.

⁴ DUNNILL, P. M. et FOWDEN, L. (1963) *Phytochemistry* **6**, 1959.

⁵ BELL, E. A. (1966), in *Comparative Phytochemistry* (SWAIN, T., ed.), p. 195, Academic Press, London.

⁶ SENEVIRATNE, A. S. et FOWDEN, L. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1039.

la présence ou l'absence d'acides aminés ou de dipeptides libres mis en évidence par chromatographie bidimensionnelle sur papier ou par électrophorèse à haut voltage

Les variations de concentration des acides aminés protéiques ont été utilisées par Reuter⁷ comme critère taxonomique. Cependant, la présence de tous les acides aminés protéiques dans tous les organismes végétaux rend leur étude comparative très difficile. Les différences

TABLEAU 1 LISTE DES ESPECES DE *Phaseolinae* ETUDIEES

No	Intr	Genres et especes	Types*	Chromosomes	Aire de repartition
Groupe		<i>Macrotyloma</i> (Wight et Arn) Verdc			
43		<i>Macrotyloma uniflorum</i> (Lam.) Verdc (<i>Dolichos uniflorus</i> Lam.)	C	20 petits	Inde
52		<i>idem</i> (<i>idem</i>)	C	20 petits	Inde
72		<i>idem</i> (<i>idem</i>)	C	20 petits	Inde
108		<i>idem</i> (<i>D. uniflorus</i> Lam. var.)	S	20 petits	Australie
256		<i>idem</i> (<i>idem</i> var. <i>uniflorus</i>)	C	20 petits	Inde
281		<i>idem</i> (<i>idem</i> var. <i>uniflorus</i>)	C	20 petits	Inde
110		<i>Macrotyloma axillare</i> (E. Mey.) Verdc (<i>D. axillaris</i> E. Mey. var. <i>axillaris</i>)	S	20 petits	Afr. Trop. Madagascar Ceylan
216		<i>idem</i> (<i>idem</i>)	S	20 petits	<i>idem</i>
97		<i>Macrotyloma africanum</i> (Wilczek) Verdc (<i>D. africanus</i> Wilczek ex Brenan)	S	20 petits	?
109		<i>idem</i> (<i>idem</i>)	S	20 petits	Togo Afr. occid.
374		<i>idem</i> (<i>idem</i>)	S	20 petits	?
277		<i>Macrotyloma ellipticum</i> (R. E. Fr.) Verdc (<i>D. ellipticus</i> R. E. Fr.)	S	20 petits	Zambie Tanzanie Ht. Katanga
240		<i>Macrotyloma stenophyllum</i> (Harms) Verdc (<i>D. stenophyllum</i> Harms)	S	20 petits	Afr. centr.
Groupe		<i>Dolichos</i> L.			
168		<i>Dolichos glabrescens</i> R. Wilczek	S	20 grands	Ht. Katanga
258		<i>Dolichos trilobus</i> L. subsp. <i>trilobus</i> (<i>D. falcatus</i> Klein ex Willd.)	S	20 grands	Afr. trop. orientale
351		<i>Dolichos sericeus</i> E. Mey. subsp. <i>pseudofalcatus</i> Verdc (<i>D. formosus</i> A. Rich. var.)	S	20 grands	Afr. trop. orientale
357†		<i>Dolichos sericeus</i> E. Mey. subsp. <i>sericeus</i> (<i>D. formosus</i> A. Rich. var.)	S	20 grands	<i>idem</i>
Groupe		<i>Pseudovigna</i> (Harms) Verdc			
179		<i>Pseudovigna argentea</i> (Willd.) Verdc (<i>D. argenteus</i> Willd.)	S	20 grands	Togo, Dahomey Afr. orientale

* Types S—sauvage, C—cultive

† *D. sericeus* greffe sur *D. trilobus* (258)

⁷ REUTER, G. (1957) *Flora* **145**, 326

de concentration observées peuvent être dues à diverses causes qui ne sont pas nécessairement d'origine génétique. La teneur en un acide aminé peut varier, dans une espèce particulière, avec l'environnement, le stade de développement de la plante et aussi suivant les différents organes. Jusqu'à présent, le dosage quantitatif des acides aminés et peptides libres n'a pas été utilisé pour différencier certaines espèces de légumineuses. Cependant,

TABLEAU 2 POIDS DE 100 GRAINES ET DOSAGE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS AMINÉES (g/100 g DE GRAINES)

Especies et No d'introduction	Poids moyen de 100 graines	Matière aminée totale	Fraction acides aminés libres	Matière protéique
<i>Macrotyloma uniflorum</i>				
43 C*	2,94	21,89	1,97	19,92
52 C	3,06	22,40	1,57	20,83
72 C	3,50	17,70	1,48	16,22
108 S	1,02	20,39	1,51	18,88
256 C	1,49	20,76	1,76	19,00
281 C	2,97	21,53	1,88	19,65
<i>Macrotyloma axillare</i>				
110 S	1,17	20,50	1,67	18,83
216 S	1,10	28,26	2,24	26,02
<i>Macrotyloma africanum</i>				
97 S	0,51	22,77	1,83	20,94
109 S	0,60	21,48	1,76	19,72
374 S	0,85	23,10	1,69	21,41
<i>Macrotyloma ellipticum</i>				
277 S	0,90	23,44	1,16	22,28
<i>Macrotyloma stenophyllum</i>				
240 S	0,60	20,38	1,07	19,31
<i>Dolichos glabrescens</i>				
168 S	6,20	19,12	0,38	18,74
<i>Dolichos trilobus</i>				
258 S	2,09	25,86	0,74	25,12
<i>Dolichos sericeus</i>				
351 S	2,08	21,21	0,62	20,59
357 S	2,80	17,72	0,97	16,75
<i>Pseudovigna argentea</i>				
179 S	5,30	29,87	0,21	29,66

* C—forme cultivée, S—forme sauvage

l'analyse par chromatographie sur colonnes à l'aide de l'appareil automatique d'acides aminés donne des résultats quantitatifs avec une précision suffisante. Nous avons appliqué cette technique au dosage des acides aminés et dipeptides libres de différentes espèces de Phaseolinae. Il est en effet connu que cette sous-tribu groupe un nombre élevé d'espèces souvent mal définies; elle pose au systématicien des problèmes ardu.

Verdcourt⁸ a subdivisé récemment l'ancien genre *Dolichos* en trois nouveaux genres *Macrotyloma*, *Dolichos* et *Pseudovigna*. Cette différenciation se base sur un ensemble de caractères morphologiques, palynologiques et cytologiques.

Otoul⁹ a relevé des différences importantes dans la répartition des acides aminés totaux de diverses espèces des genres précités (voir Tableau 1).

Nous avons mis en évidence, dans la fraction acides aminés libres de plusieurs espèces de *Macrotyloma* et de *Dolichos* un peptide qui a été isolé et identifié comme étant la γ -glutamyl-phénylalanine¹⁰. Il se trouve à une concentration très importante dans certaines espèces. Il pourrait être à la base des différences trouvées par Otoul.

Il nous a paru intéressant de déterminer la part des acides aminés libres et du dipeptide dans les teneurs en acides aminés totaux en vue d'une différenciation taxonomique.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau 2 nous donne le poids moyen de 100 graines ainsi que les résultats des dosages de la matière aminée totale, de la fraction acides aminés libres et de la matière protéique, celle-ci est obtenue par différence des deux premières analyses.

En ce qui concerne les matières aminées protéique et totale, il ne semble pas que leurs valeurs soient caractéristiques des genres ou espèces envisagés. Pour la fraction acides

TABLEAU 3 ACIDES AMINES LIBRES EXPRIME

Acides aminés No Intr	<i>Macrotyloma uniflorum</i>					
	43	52	72	108	256	281
γ -Glutamylphénylalanine	1,23	0,85	0,98	0,98	1,10	1,27
Asparagine	0,16	0,24	0,05	0,05	0,06	0,07
Ac aspartique	0,14	0,13	0,08	0,08	0,08	0,09
Ac glutamique	0,11	0,09	0,12	0,14	0,11	0,16
Phénylalanine	0,05	0,04	0,06	0,05	0,08	0,07
Proline	0,02	0,05	0,03	0,05	0,15	0,02
Glycine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Alanine	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
Valine	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Isoleucine	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
Leucine	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lysine	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
Histidine	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,03
Arginine	0,12	0,09	0,06	0,04	0,07	0,06

* Les valeurs 0,00 indiquent une concentration inférieure à 0,01 %.

⁸ VERDCOURT, B. (1970) *Kew Bull* 24, 379

⁹ OTOUL, E. (1973) *Bull Rech Agron Gembloux*, sous presse

¹⁰ DARDENNE, G A et THONART, PH (1973) *Phytochemistry* 12, 473

aminés libres, celle-ci est généralement plus importante dans le genre *Macrotyloma* que dans le genre *Dolichos*. *Pseudovigna* se caractérise par une valeur particulièrement faible. Il faut remarquer aussi qu'il n'y a pas de relation entre les valeurs des diverses fractions aminées et la forme spontanée ou cultivée du végétal. De plus, le poids de 100 graines ne peut être considéré comme un facteur déterminant dans les teneurs en acides aminés libres ou totaux.

Le Tableau 3 nous montre les pourcentages des acides aminés libres et du dipeptide par rapport au poids de graines (PCPG). Nous avons également représenté au Tableau 4 les pourcentages des principaux acides aminés libres et du dipeptide par rapport à la matière aminée libre (PCAAL) et par rapport à la matière aminée totale (PCAAT).

Sur tous les résultats obtenus, nous avons testé l'hypothèse d'égalité des moyennes des teneurs de chaque acide aminé des deux populations *Macrotyloma* et *Dolichos*. Nous n'avons pas pris en considération le genre *Pseudovigna* qui est, au point de vue des teneurs en acides aminés, totalement différent. Au niveau de la variance résiduelle, nous avons confondu variations inter et intraspécifiques.

Nous avons comparé les résultats du test pour un même acide aminé exprimé par rapport à diverses bases de référence (PCPG, PCAAL, PCAAT). Au niveau des acides aminés libres, le test est hautement significatif pour la γ -glutamylphénylalanine quelque soit le mode de représentation. Pour la phénylalanine, l'arginine, l'acide aspartique et l'acide glutamique, l'analyse de la variance donne des résultats très différents suivant le mode d'expression.

EN POUR CENT PAR RAPPORT AU POIDS DE GRAINES*

<i>Macrotyloma axillare</i>		<i>Macrotyloma africanum</i>			<i>Macrotyloma ellipticum</i>	<i>Macrotyloma stenophyllum</i>	<i>Dolichos glabrescens</i>	<i>Dolichos trilobus</i>	<i>Dolichos sericeus</i>		<i>Pseudovigna argentea</i>
110	216	97	109	374	277	240	168	258	351	357	179
1,49	1,19	1,10	1,04	1,03	0,79	0,21	0,03	0,05	0,31	0,36	0,00
0,04	0,16	0,12	0,11	0,10	0,06	0,09	0,02	0,00	0,04	0,25	0,05
0,04	0,07	0,10	0,14	0,11	0,03	0,06	0,05	0,04	0,01	0,02	0,07
0,10	0,14	0,16	0,21	0,16	0,11	0,10	0,09	0,20	0,04	0,07	0,08
0,13	0,06	0,12	0,09	0,08	0,04	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02	0,00
0,02	0,02	0,08	0,04	0,04	0,00	0,20	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
0,04	0,03	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,02	0,00
0,03	0,13	0,04	0,05	0,04	0,06	0,33	0,14	0,36	0,12	0,16	0,00

* Les concentrations en glutamine, sérine, thréonine, méthionine et tyrosine sont toutes inférieures à 0,01 %

TABLEAU 4 POURCENTAGE DES PRINCIPAUX ACIDES AMINÉS LIBRES PAR RAPPORT

Acides aminés No Intr	<i>Macrotyloma uniflorum</i>					
	43	52	72	108	256	281
γ -Glutamylphénylalanine*	65,06 5,63	55,91 3,80	69,57 5,57	67,44 4,78	65,09 5,28	70,57 5,90
Asparagine†	8,69 0,76	15,59 1,07	3,20 0,26	3,53 0,25	3,46 0,28	4,08 0,34
Ac aspartique	7,45 0,65	8,51 0,58	5,65 0,45	5,54 0,39	4,81 0,39	5,14 0,43
Ac glutamique	5,91 0,51	6,15 0,42	8,47 0,68	9,91 0,70	6,52 0,53	8,79 0,73
Phénylalanine	2,68 0,23	2,59 0,18	4,18 0,33	3,68 0,26	4,80 0,39	3,83 0,32
Proline	0,97 0,08	3,08 0,21	2,18 0,17	3,37 0,24	8,87 0,72	1,13 0,09
Alanine	0,28 0,02	0,20 0,02	0,40 0,03	0,37 0,03	0,33 0,03	0,42 0,04
Lysine	0,45 0,04	0,41 0,03	0,40 0,03	0,29 0,02	0,28 0,02	0,00 0,00
Histidine	1,34 0,12	1,10 0,07	0,84 0,07	2,21 0,16	0,87 0,07	1,91 0,16
Arginine	6,28 0,54	6,17 0,42	4,44 0,36	2,69 0,19	4,25 0,34	3,19 0,27

Au niveau des acides aminés totaux, les conclusions sont très différentes pour l'arginine, la lysine, la sérine, la leucine, l'isoleucine, la valine et l'alanine, l'hypothèse nulle est à rejeter simplement dans le cas de la phénylalanine. Ces conclusions sont importantes pour de futures études chimiotaxonomiques mettant en oeuvre les concentrations en acides aminés car l'utilisation de bases de référence différentes peut conduire à des conclusions apparemment contradictoires.

Nous avons aussi étudié, au niveau des genres et des espèces, la répartition des principaux acides aminés libres et du dipeptide en vue de leur importance taxonomique. Au niveau des genres, nous avons fait abstraction de la variation interspécifique et nous avons considéré les moyennes des teneurs en acides aminés.

Le genre *Pseudovigna* se caractérise par l'absence de γ -glutamylphénylalanine et une teneur en acides aminés libres très faible. Le genre *Macrotyloma* présente en général une concentration importante en ce dipeptide, une teneur en acides aminés libres élevée et une concentration en arginine faible. Le genre *Dolichos* a une concentration en γ -glutamylphénylalanine faible, une teneur en acides aminés libres moins élevée et une concentration en arginine assez importante.

On remarque qu'aucun acide aminé libre ne parvient à lui seul à différencier complètement les trois genres. En effet, *M. stenophyllum* n'est pas séparé des *Dolichos* si on compare sa teneur en dipeptide. Cependant, les teneurs en γ -glutamylphénylalanine et aussi en

A LA MATIERE AMINEE LIBRE TOTALE* ET LA MATIERE AMINEE TOTALE†

<i>Macrotyloma axillare</i>		<i>Macrotyloma africanum</i>			<i>Macrotyloma ellipticum</i>	<i>Macrotyloma stenophyllum</i>	<i>Dolichos glabrescens</i>	<i>Dolichos trilobus</i>	<i>Dolichos sericeus</i>		<i>Pseudovigna argentea</i>
110	216	97	109	374	277	240	168	258	351	357	179
74,41	69,32	62,79	61,19	63,05	70,99	19,54	8,43	6,33	50,89	38,70	0,00
5,78	5,24	4,85	4,88	4,43	3,38	1,02	0,17	0,18	1,44	2,06	0,00
2,32	7,40	6,99	6,26	6,40	5,38	8,76	5,83	0,00	6,28	27,01	21,54
0,18	0,56	0,54	0,50	0,45	0,26	0,46	0,12	0,00	0,18	1,45	0,16
2,37	3,37	5,74	8,14	6,57	2,99	5,74	12,73	5,32	1,81	2,20	31,78
0,18	0,25	0,44	0,65	0,46	0,14	0,30	0,25	0,15	0,05	0,12	0,23
6,23	6,59	8,90	12,25	9,64	9,61	9,23	24,89	26,61	7,12	7,22	38,79
0,48	0,50	0,69	0,98	0,68	0,46	0,48	0,49	0,76	0,20	0,38	0,28
8,05	2,99	6,66	5,12	5,07	4,00	2,30	2,07	1,00	5,14	2,05	0,84
0,62	0,23	0,51	0,41	0,36	0,19	0,12	0,04	0,03	0,15	0,11	0,01
1,28	1,11	4,49	2,45	2,48	0,00	19,19	1,75	1,97	0,76	0,84	0,00
0,10	0,08	0,35	0,20	0,18	0,00	1,00	0,03	0,06	0,02	0,04	0,00
0,36	0,46	0,59	0,31	0,39	0,60	0,47	2,20	2,36	0,95	1,13	1,78
0,03	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	0,07	0,03	0,06	0,01
0,26	0,30	0,27	0,24	0,34	0,48	0,48	1,09	1,69	0,83	0,57	0,00
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,02	0,03	0,00
2,33	1,57	0,58	0,11	1,35	0,15	1,04	1,43	0,00	5,49	2,12	0,89
0,18	0,12	0,04	0,01	0,09	0,01	0,05	0,03	0,00	0,16	0,11	0,01
1,64	5,89	2,19	2,82	2,69	5,08	31,14	37,88	49,15	19,77	17,17	1,36
0,13	0,44	0,17	0,23	0,19	0,24	1,62	0,75	1,40	0,56	0,91	0,01

arginine, acide glutamique et proline permettent de différencier certaines espèces; en particulier nous avons ainsi pu séparer *M. stenophyllum* de *D. sericeus*. Le Schema 1 résume ces conclusions.

Les concentrations en acides aminés libres semblent être, dans certains cas, caractéristiques de certaines espèces et aussi d'entités plus importantes telles que les genres.

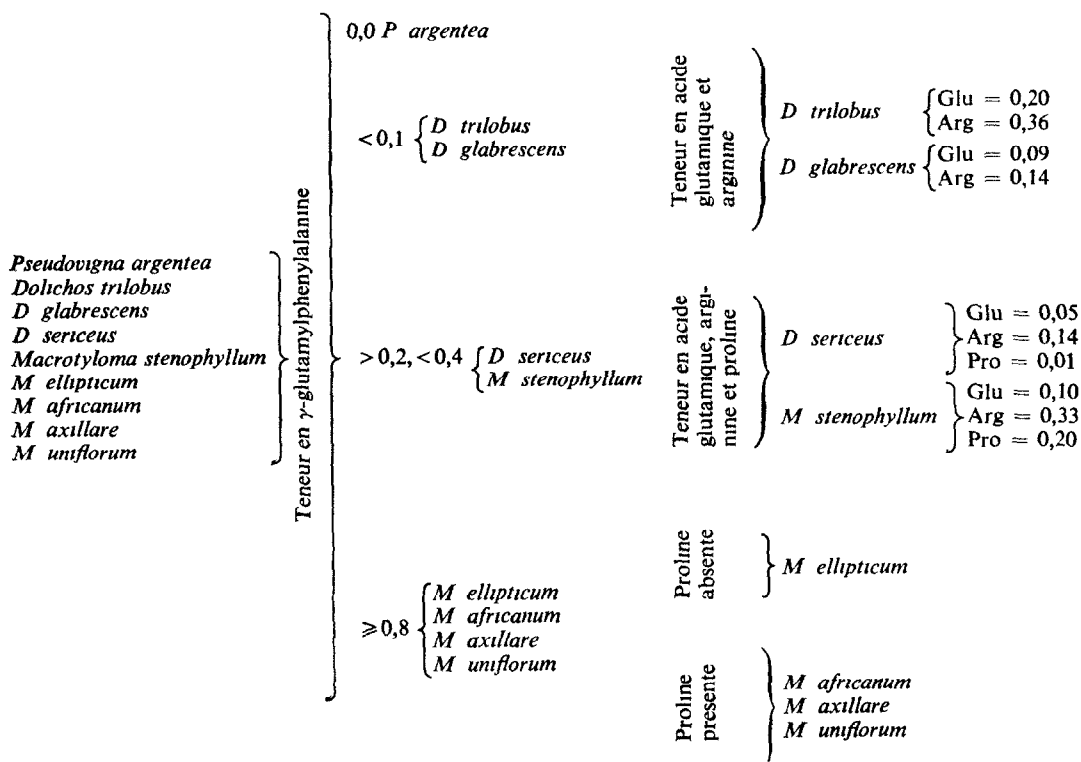
Il serait intéressant de déterminer l'influence des facteurs écologiques sur les variations des teneurs en acides aminés libres. Nous pensons cependant que la plupart des différences observées dans ce travail sont probablement dues à des variations taxonomiques.

Nous avons également calculé les teneurs en acides aminés protéiques et examiné leurs variations en fonction des espèces. La Fig. 1 représente les différentes concentrations de certains acides aminés protéiques. Les variations de chaque acide aminé au sein d'une même espèce sont généralement parallèles et il semble qu'elles soient beaucoup plus caractéristiques de la concentration en matière aminée des échantillons plutôt que de l'espèce ou du genre.

Au niveau des acides aminés protéiques, la distribution entre variations écologiques et taxonomiques est très difficile à définir. L'hypothèse de l'égalité des teneurs en acides aminés protéiques dans les genres *Macrotyloma* et *Dolichos* n'est pas à rejeter. Seul, le genre *Pseudovigna* se caractérise par des teneurs plus élevées qui le différencie nettement des deux autres genres. Ce fait n'est pas étonnant car Maréchal et Otoul¹¹ signalaient que cette

espèce présentait des caractères morphologiques qui se retrouvent notamment chez les Galactiinae. D'autre part, Verdcourt,¹² dans sa description latine du genre *Pseudovigna*, indique une très forte affinité avec le genre *Pueraria* D. C.

Il nous a également semblé intéressant de comparer les teneurs en acides aminés libres,



SCHEMA 1 PRINCIPALES VARIATIONS DES TENEURS EN ACIDES AMINES LIBRES (g/100 g de graines) DANS LES DIFFERENTES ESPECES DE PHASEOLINAE

protéiques et totaux. Nous avons ainsi pu montrer l'importance de la phénylalanine et de l'acide glutamique libres. La Fig. 2 nous montre les variations des teneurs en phénylalanine dans les différentes espèces. Au niveau de certains *Macrotyloma*, la phénylalanine non protéique (libre et provenant du dipeptide) représente plus de 40 % de la phénylalanine totale et plus de 90 % de la phénylalanine protéique, l'acide glutamique libre représente environ 20 % de l'acide glutamique total et 25 % de l'acide glutamique protéique.

Ces considérations peuvent être importantes au niveau des problèmes de sélection permettant d'améliorer les teneurs en acides aminés essentiels des graines de légumineuses.

¹¹ MARECHAL, R. et OTOUL, E. (1966) *Bull. Jard. Bot. Bruxelles* 36, 235.

¹² VERDCOURT, B. (1970) *Kew Bull.* 24, 390.

dans un but alimentaire. Du point de vue chimiotaxonomique, cette étude apporte des arguments supplémentaires pour justifier la nouvelle subdivision du genre *Dolichos* introduite par Verdcourt⁸

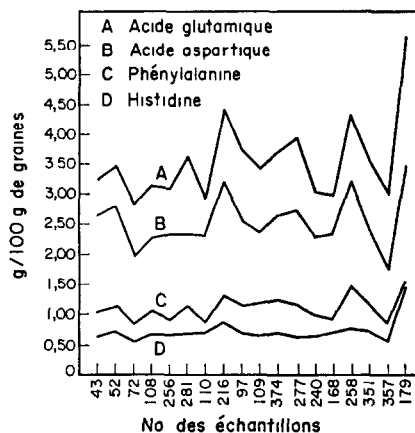


FIG 1 CONCENTRATIONS EN g/100 g DE GRAINES DE QUATRE ACIDES AMINÉS PROTÉIQUES DANS LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *Macrotyloma*, *Dolichos* ET *Pseudovigna*

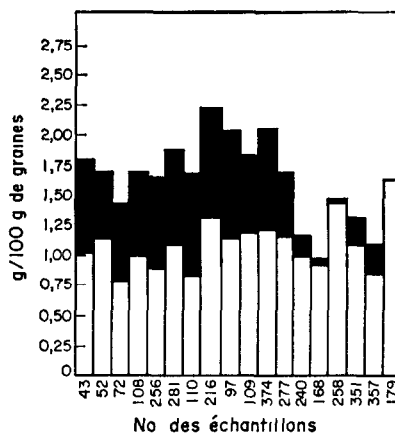


FIG 2 CONCENTRATION DE LA PHÉNYLALANINE EN g/100 g DE GRAINES DANS LES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *Macrotyloma*, *Dolichos* ET *Pseudovigna*. En blanc—phénylalanine protéique, en noir—phénylalanine libre et provenant du dipeptide

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel La liste des espèces figure au Tableau 1. Pour la désignation de celles-ci, nous avons adopté la nomenclature proposée récemment par Verdcourt⁸ tout en indiquant en synonymie les noms généralement admis avant la révision de cet auteur. Les numéros d'introduction correspondent aux numéros des échantillons d'herbiers conservés à la Chaire de Phytotechnie des Régions Chaudes, Gembloux. Les graines proviennent de plantes cultivées en serres conditionnées. La détermination du matériel a été soigneusement contrôlée par Marechal avec la collaboration de Wilczek. Le nombre de chromosomes a été déterminé à partir du même matériel^{13,14}.

Préparation des extraits Les graines préalablement séchées à l'étuve à 40° pendant 48 hr sont broyées au moulin à marteaux et une prise d'essai (1 g) est extraite plusieurs fois avec un mélange alcool-H₂O (1/1) jusqu'à réaction négative à la ninhydrine. Les extraits sont rassemblés et homogénéisés. Les échantillons destinés à la 2-D PC sont purifiés sur une petite colonne de résine échangeuse de cations. Le résidu provenant de l'éluat ammoniacal est repris par 6 ml du mélange alcool-H₂O et une quantité adéquate est chromatographiée. Les échantillons destinés à l'analyseur automatique d'acides aminés ne sont pas soumis à une purification préalable, les extraits sont évaporés à sec et le résidu est dissous dans 10 ml de tampon citrate (pH 2,2). Cette solution est passée sur une petite colonne de Dowex 2 X10, forme Cl⁻ et une prise d'essai est utilisée pour l'analyse.

Dosage des acides aminés Le dosage des acides aminés libres et du dipeptide a été réalisé en deux étapes: analyse semi-quantitative par 2-D PC et analyse quantitative avec l'analyseur automatique. L'analyse par chromatographie sur colonnes de résines échangeuses d'ions donne des résultats quantitatifs avec une précision suffisante (3%). Malheureusement, l'utilisation du tampon au citrate de sodium ne donne pas d'excellentes séparations pour tous les acides aminés libres et les dipeptides. L'asparagine et la glutamine ne se séparent pas de la sérine et de la thréonine. L'acide pipécolique est élué avec la γ -glutamylphénylalanine.

¹³ MARECHAL, R. (1969) *Bull. Jard. Bot. Bruxelles* 39, 125.

¹⁴ MARECHAL, R. (1970) *Bull. Jard. Bot. Bruxelles* 40, 307.

L'analyse semi-quantitative sur papier nous a permis de tirer certaines informations la serine, la thréonine et la glutamine sont en concentration extrêmement faible, la concentration en asparagine est nettement plus importante que la somme des concentrations en sérine, thréonine et glutamine ce qui fait que le dosage de l'asparagine ne sera guère faussé par la présence des trois acides aminés L'acide pipécolique est en concentration moyenne mais assez constante dans tous les échantillons excepté *M. uniflorum* (72) qui en contient nettement moins et *Pseudovigna argentea* qui n'en possède pas Cet acide aminé ne gênera que très faiblement le dosage de la γ -glutamylphénylalanine car il ne donne qu'un pic très petit malgré des concentrations de solutions témoins élevées

Chromatographie bidimensionnelle. La chromatographie sur papier Whatman 3 MM a été réalisée en utilisant comme solvant pour la première dimension n -BuOH-HCOOH-H₂O (15 3 2) et pour la seconde dimension PhOH saturé par un tampon à pH 4,2 (acide citrique-Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,08 M) Les acides aminés ont été révélés par pulvérisation avec une solution de ninhydrine à 0,25 % dans l'EtOH et chauffage à l'étuve à 110° pendant 10 min

Analyse automatique. L'appareil est un Beckman Unichrom Nous avons appliqué la méthode de Devenyi¹⁵ simple colonne, 2 tampons au citrate de Na (pH 3,28 et 4,25) La détermination de l'azote total a été réalisée par la méthode du semi-micro Kjeldahl En vue de l'analyse des acides aminés totaux, la poudre de graines a été soumise à une hydrolyse acide (HCl 6 N) pendant 22 hr à 110°

Remerciements—Nous tenons à remercier les Professeurs F Hendrickx et J Casimir pour l'aide qu'ils nous ont apportée au cours de ce travail Nous remercions aussi le Professeur P Dagnehe qui nous a permis d'effectuer une partie appréciable de nos calculs au service de statistique

¹⁵ DEVENYI, T (1968) *Acta Biochem Biophys Acad Sci Hung* 3 (4), 429